

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-194976

(43)Date of publication of application : 28.07.1998

(51)Int.Cl.

A61K 31/715
// C08B 37/00
C12P 19/14

(21)Application number : 09-006524

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD
TAKEDA SHOKUHIN KOGYO KK

(22)Date of filing : 17.01.1997

(72)Inventor : KAJIKAWA MASAHIRO
KAMENO MASAOKI
MUROZAKI SHINJI
KUSAKA HIROAKI

(54) IMMUNOSUPPRESSANT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject immunosuppressant not producing a serious side effect and excellent in an immunosuppressive action, especially an antilymphocytic action by including a specific linear saccharide as an active ingredient.

SOLUTION: This immunosuppressant contains a thermally treated linear saccharide comprising β -1,3-glycoside bonds as an active ingredient. The saccharide preferably comprises a curdian hydrolysate, especially an acid curdian hydrolysate using formic acid or the curdian hydrolysate using β -1,3-glucanase, and has a number-average mol.wt. of 340-4000. The thermal treatment is preferably carried out at a temperature of $\geq 80^{\circ}$ C in an aqueous solution. Concretely, a 0.5-5.0wt.% curdian aqueous solution containing an acid in a concentration of 1-85wt.% is subjected to an acid hydrolysis reaction at a temperature of 70-100 $^{\circ}$ C for about 10min.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-194976

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月28日

(51) IntCl.⁸
A 6 1 K 31/715
// C 0 8 B 37/00
C 1 2 P 19/14

識別記号
A B C

F I
A 6 1 K 31/715
C 0 8 B 37/00
C 1 2 P 19/14

A B C
C
Z

審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平9-6524

(22) 出願日 平成9年(1997) 1月17日

(71) 出願人 000002934
武田薬品工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(71) 出願人 000238511
武田食品工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号
(72) 発明者 梶川 昌弘
兵庫県川西市水明台1丁目1番85
(72) 発明者 亀野 昌昭
兵庫県加古川市加古川町北在家482番地7
(72) 発明者 室崎 伸二
奈良県奈良市芝辻町三丁目6番27-208号
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 重篤な副作用のない免疫抑制剤の提供。

【解決手段】 加熱処理した β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖の糖類を有効成分とする免疫抑制剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 加熱処理された β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖の糖類を有効成分とする免疫抑制剤。

【請求項2】 β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖の糖類がカードラン加水分解物である請求項1記載の免疫抑制剤。

【請求項3】 加水分解物が酸加水分解物である請求項2記載の免疫抑制剤。

【請求項4】 酸加水分解に使用する酸が蟻酸である請求項3記載の免疫抑制剤。

【請求項5】 加水分解物が β -1,3-グルカナーゼによる加水分解物である請求項2記載の免疫抑制剤。

【請求項6】 β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖の糖類の数平均分子量が340から4000の範囲にある請求項1〜5いずれか1項記載の免疫抑制剤。

【請求項7】 加熱処理が水溶液中で80℃以上の温度である請求項1〜6いずれか1項記載の免疫抑制剤。

【請求項8】 免疫抑制作用がリンパ球抑制作用である請求項1〜7いずれか1項記載の免疫抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、重篤な副作用のない免疫抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】生体内の免疫系は、細菌、酵母、カビ、ウイルスなどの微生物による感染や、腫瘍に対する防御に重要な役割を果たしており、その主要な機構は、Tリンパ球およびBリンパ球が、これらの微生物や腫瘍を、抗原受容体を介して認識することにより刺激を受け、抗原特異的に活性化し、これの異物を排除する能力を高めることである。しかし、自己免疫疾患や、臓器移植の拒否反応などの治療、抑制においては、免疫応答を抑制することが必要であり、そのために免疫抑制剤が使用される。現在、免疫抑制剤としては、抗原非特異性のステロイド剤や核酸合成系に作用する薬剤が多く使用されているが、これらは、重篤な副作用を生ずることがある。また、シクロスポリン等、臓器移植の拒否反応の抑制に使用される免疫抑制剤にも、様々な副作用を伴うものがある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、重篤な副作用なしに優れた免疫抑制作用を示す免疫抑制剤を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、糖類および免疫に関する研究を進める上で、加熱処理した直鎖の β -1,3-グルカンが、リンパ球抑制作用を示すことを見いだした。かかる加熱処理 β -1,3-グルカンは、免疫担当細胞が抗原特異的および抗原非特異的な刺激を受けたときのBおよびTリンパ球の活性化を抑制する作用

を有する。すなわち、該加熱処理 β -1,3-グルカンを脾臓細胞の培養系に添加すると、マイトジェン刺激を加えずに培養したときの生細胞数および細胞代謝活性はそれほど損なわず、Bリンパ球マイトジェン刺激下で培養したときのリンパ球の生細胞数、特に、Bリンパ球の生細胞数の増加および細胞代謝活性の上昇を強度に抑制し、Tリンパ球マイトジェン刺激下で培養したときの細胞代謝活性の上昇を強度に抑制した。この抑制作用は、リンパ球が活性化されるときにより選択的に働くことから、従来の免疫抑制剤が示した非特異的な作用とは異なることを示しており、また、Bリンパ球の活性化を強度に抑制することから、近年提案された免疫抑制剤のTリンパ球に対する選択的な作用とも異なることを示している。そのため、公知のステロイド剤に認められる様々な副作用、核酸合成系に作用する薬剤に認められる造血器などの重篤な副作用、また、シクロスポリン、FK506に認められる腎障害、肝障害等の副作用はないと考えられる。また、該加熱処理 β -1,3-グルカンはBリンパ球の活性化を強度に抑制するため、Bリンパ球の異常によって引き起こされる悪性リンパ腫、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患またはアレルギー疾患の治療にきわめて有用である。さらにTリンパ球の活性化も抑制するため、臓器移植の拒絶反応の予防にも有用であると考えられる。

【0005】本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものであって、加熱処理された β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖の糖類を有効成分とする免疫抑制剤を提供するものである。用いる β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖の糖類としては、カードラン加水分解物が挙げられる。特に、酸加水分解物、とりわけ蟻酸加水分解物や、 β -1,3-グルカナーゼのような酵素による加水分解物で、数平均分子量が340から4000の範囲にあるものが好ましい。加熱処理としては、水溶液中で80℃以上での加熱が好ましい。本発明の免疫賦活剤は、副作用がなく、常用に適しており、免疫抑制用の医薬として好適である。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明において、加熱処理に供される β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖の糖類としては、グルコース分子が分岐せずに、 β -1,3-グルコシド結合により結合したオリゴ糖ないしは多糖であり、代表的な例としては、アルカリゲネス (Alkaligenes) 属又はアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌が産生する、 β -1,3-グルコシド結合を有する多糖類であるカードランの加水分解物が挙げられる。以下、カードランの加水分解物を例として本発明を説明する。カードランの加水分解物は、自体公知の多糖類の加水分解法により調製できるが、得られる加水分解物の免疫抑制活性から、蟻酸、酢酸のような有機酸、塩酸、硫酸のような無機酸、特に、蟻酸あるいは β -1,3-グ

ルカーゼのような酵素で行うことが好ましく、数平均分子量が、340～4000の範囲のものが好ましい。

【0007】本明細書における数平均分子量は、以下の条件で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定したものである。測定装置としては、東ソー（株）製の高速液体クロマトグラフィー装置を使用した。

検出器：RI-8022

ポンプ：CCPM-11

カラムオープン：CO-8020

脱気装置：SD-8022

オートサンプラー：AS-8020

測定カラムは、TSKゲルのカラム（G-OLIGOWPWまたはG-3000PWXL、7.8φmm×30cm）を用い、流速0.6～0.7ml/分、温度40℃で測定した。試料の0.02%水溶液を調製し、その200μlを用いた。溶出は純水で行った。一方、分子量既知のプルラン標準品を同様に測定して較正曲線を作成し、この較正曲線を基に、東ソー（株）のGPC-LALLSプログラムとマイクロソフト（株）の計算プログラム「エクセル」によって分子量分布関数を求め、数平均分子量として換算した。

【0008】酸加水分解は、例えば、1～85重量%程度の酸を含有するカードランの0.5～5.0重量%水溶液を、70～100℃にて10分～3時間加熱することにより行うことができる。加水分解反応液を水酸化ナトリウム等のアルカリ剤で中和し、遠心分離して上澄を得、必要に応じて、活性炭処理、透析、溶媒分画、加熱によるホルミル基の除去等の自体公知の方法で精製することにより、所望の加水分解物が得られる。酵素による加水分解は、例えば、用いる酵素に適したpH、温度で所定時間、カードランの0.5～3重量%水溶液を酵素処理することにより行うことができる。ついで、酵素を失活させた後、遠心分離して上澄を得、必要に応じて活性炭処理、透析、溶媒分画等の自体公知の方法で精製することにより、所望の加水分解物が得られる。

【0009】得られた加水分解物は、水溶液の状態で加熱処理に付される。加熱処理は、一般に、80℃以上、好ましくは、90～120℃にて、通常、10～30分間加熱することにより行う。加熱手段は、特に限定するものではなく、加熱後、直ちに室温まで冷却する。

【0010】加熱処理されたカードラン加水分解物は、そのまま本発明の免疫抑制剤として使用できる。また、自体公知の医薬担体または賦形剤と自体公知の方法で合して、免疫抑制用の医薬とすることができる。用いる、医薬担体または賦形剤は特に限定するものではなく、当該免疫抑制剤の具体的用途に応じて当業者が適宜選択できる。また、免疫抑制剤の形態も特に限定する物ではなく、具体的用途に応じて、種々の固体や液体の形態とすることができる。本発明の免疫抑制剤は、経口投与、非経口投与いずれでもよく、その投与量は、カードラン加

水分解物の固形分量として1日当たり4mg～40gである。本発明の免疫抑制剤は、ステロイド剤に認められる様々な副作用、核酸合成系に作用する薬剤に認められる造血器などの重篤な副作用、また、シクロスポリン、FK506に認められる腎障害、肝障害等の副作用はなく、また、本発明はBリンパ球の活性化を強度に抑制するため、Bリンパ球の異常によって引き起こされる悪性リンパ腫、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患またはアレルギー疾患の治療にきわめて有用である。さらにTリンパ球の活性化も抑制するため、臓器移植の拒絶反応の予防にも有用である。

【0011】

【実施例】つぎに、実施例および試験例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

実施例1

酵素によるカードラン加水分解物の調製

カードラン4gを0.05M酢酸緩衝液200mlに分散し、ヒロタケ酵素18ユニット/mlを添加した。これを40℃に昇温し、4時間インキュベートした後沸騰水浴中に15分間保持して酵素を失活させた。ついで、冷却、遠心分離して沈澱部分を除去し、上澄を直径5cmの高さ30cmのカラムに詰めた活性炭に吸着させ、1000mlの水で洗浄後、さらに4%エタノール2000mlで洗浄した。ついで、20%エタノール2000mlで吸着成分を溶出し、これをエバポレーターで濃縮した後、凍結乾燥した。このものはHPLCで測定したときの数平均分子量が340（プルラン換算値）であった。このものを、水溶液中で、100℃にて、10分間加熱し、ついで冷却して免疫抑制剤を得た。

【0012】実施例2

蟻酸によるカードラン加水分解物の調製

カードラン30グラムを85%蟻酸3000ml中に分散し、90℃まで加温して20分間保持した。ついで、容器ごと冷水にさらして室温まで冷却し、エバポレーターで濃縮した後、5N NaOHで中和してpH7とし、遠心分離した。上澄はホルミル基を除去するため沸騰水浴中で120分間加熱したが、このとき、pHが低下したので、2N NaOHを添加して7に戻した。このものをビスキングチューブ中にいれ純水10リットルに対して一夜透析し、透析内液を凍結乾燥した。このものをHPLCで測定したときの数平均分子量はプルラン換算で約2800であった。このものを、水溶液中で100℃にて10分間加熱し、ついで冷却して免疫抑制剤を得た。

【0013】試験例1

実施例1で得た酵素分解カードランおよび実施例2で得た蟻酸分解カードランを用いて、マウス脾臓リンパ球増殖反応に対する酵素分解カードラン熱処理品および蟻酸分解カードラン熱処理品の作用を調べることにし、酵素分解カードラン熱処理品および蟻酸分解カードラン熱

処理品のリンパ球代謝活性上昇およびリンパ球増殖の抑制効果を検証した。マウス(C57BL/6、雌、14週齢)から無菌的に脾臓を摘出し、RPMI 1640培地中で脾臓を押しつぶし、200メッシュの篩に通し脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液の細胞数を自動血球計測装置により測定した後、細胞数を $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度にRPMI 1640培地で調製し、96穴組織培養プレートに1穴あたり100マイクロリットルを播種した。Bリンパ球増殖刺激物質のリボポリサッカライドを200マイクログラム/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液、Tリンパ球増殖刺激物質のコンカナバリンAを8マイクログラム/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液、あるいはRPMI 1640培地を、それぞれ1穴あたり50マイクロリットル播種した脾臓細胞浮遊液に加えて、Bリンパ球刺激群、Tリンパ球刺激群、無刺激群とした。これらの3群にリン酸緩衝生理食塩水を100℃、10分間加熱して冷却した液(対照)あるいは酵素分解カードランを8mg/mlの濃度でリン酸緩衝生理食塩水に溶解し100℃、10分間加熱して冷却した液、蟻酸分解カードランを8mg/mlの濃度でリン酸緩衝生理食塩水に溶解し100℃、10分間加熱して冷却した液をそれぞれ1穴あたり50マイクロリットル加え、37℃の5%炭酸ガス培養器内で2日間培養し、培養後の生細胞数と細胞代謝活性を調べた。

【0014】生細胞数の測定は、培養細胞液の細胞数を

自動血球計測装置で測定した後、培養細胞液200マイクロリットルにR-フィコエリトリンで標識したマウスBリンパ球に対する特異抗体の抗マウスCD45R抗体を1マイクログラム、フルオロセインイソチオシアネートで標識したマウスTリンパ球に対する特異抗体の抗マウスT細胞レセプター(アルファ/ベータ)抗体を1マイクログラム、および死細胞を特異的に染色する7-アミノアクチノマイシンDを1マイクログラム加え、5℃で30分間放置した後、RPMI 1640培地で洗浄し、フローサイトメーターで総細胞に占めるBリンパ球およびTリンパ球の割合ならびにBリンパ球およびTリンパ球に占める死細胞の割合を測定し、Bリンパ球およびTリンパ球の生細胞数を算出した。細胞代謝活性は、培養の終わる3時間前に臭化3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2Hテトラゾリウムを5mg/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液を1穴あたり10マイクロリットル加え、培養終了時に20%ドデシル硫酸ナトリウム溶液を1穴あたり50マイクロリットル加え、37℃で1日放置後、マイクロプレートリーダーで培養液の吸光度550nmを測定することにより細胞代謝活性を求めた。表1にその結果を示す。

【0015】

【表1】

	生細胞数(×10 ⁵ /ml)		細胞代謝活性 (吸光度550nm)
	Bリンパ球	Tリンパ球	
無刺激群			
対照	0.24	1.68	0.010
酵素分解カードラン熱処理品	0.06	1.12	0.012
蟻酸分解カードラン熱処理品	0.12	1.50	0.008
Bリンパ球刺激群			
対照	0.82	2.28	0.019
酵素分解カードラン熱処理品	0.04	0.74	0.011
蟻酸分解カードラン熱処理品	0.07	0.95	0.009
Tリンパ球刺激群			
対照	1.53	4.50	0.127
酵素分解カードラン熱処理品	0.32	1.95	0.044
蟻酸分解カードラン熱処理品	1.00	3.37	0.042

【0016】表1に示すごとく、無刺激群においては、酵素分解カードラン熱処理品および蟻酸分解カードラン熱処理品はいずれもBリンパ球の生細胞数を軽度になく減少させず細胞代謝活性にはほとんど影響を及ぼさな

ったが、Bリンパ球刺激群においては、酵素分解カードラン熱処理品および蟻酸分解カードラン熱処理品はいずれもBリンパ球の生細胞数を大幅に減少させ細胞代謝活性の上昇を完全に抑制した。Tリンパ球刺激群において

は、酵素分解カードラン熱処理品および蟻酸分解カードラン熱処理品はいずれも細胞代謝活性の上昇を強度に抑制した。この様に、酵素分解カードラン熱処理品および蟻酸分解カードラン熱処理品のいずれにも、リンパ球が活性化されるときにより選択的に働き、強度な抑制作用が認められた。

【0017】試験例2

ラミナリビオース、ラミナリトリオース、ラミナリテトラオース、ラミナリペンタオースおよびラミナリヘキサオース（焼津水産化学）の各試薬を用いて、マウス脾臓リンパ球増殖反応に対する加熱処理ラミナリビオース、加熱処理ラミナリトリオース、加熱処理ラミナリテトラオース、加熱処理ラミナリペンタオース、加熱処理ラミナリヘキサオースの作用を調べることにより、加熱処理ラミナリビオース、加熱処理ラミナリトリオース、加熱処理ラミナリテトラオース、加熱処理ラミナリペンタオースのリンパ球代謝活性上昇抑制効果を検証した。マウス（C57BL/6、雌、18週齢）から無菌的に脾臓を摘出し、RPMI 1640培地中で脾臓を押しつぶし、200メッシュの篩に通し脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液の細胞数を自動血球計測装置により測定した後、細胞数を $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度にRPMI 1640培地で調製し、96穴組織培養プレートに1穴あたり100マイクロリットルを播種した。Bリンパ球増殖刺激物質のリボポリサッカライドを200マイクログラム/mlの濃度でRPMI

1640培地に溶解した液、Tリンパ球増殖刺激物質のコンカナバリンAを8マイクログラム/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液、あるいはRPMI 1640培地を、それぞれ1穴当たり50マイクロリットル播種した脾臓細胞浮遊液に加えて、Bリンパ球刺激群、Tリンパ球刺激群、無刺激群とした。これらの3群にリン酸緩衝生理食塩水を121℃、20分間加熱して冷却した液（対照）あるいはラミナリビオース、ラミナリトリオース、ラミナリテトラオース、ラミナリペンタオース、ラミナリヘキサオースを8mg/mlの濃度あるいは1mg/mlの濃度でリン酸緩衝生理食塩水に溶解し121℃、20分間加熱して冷却した液、をそれぞれ1穴当たり50マイクロリットル加え、37℃の5%炭酸ガス培養器内で1日間培養し、培養後の細胞代謝活性を調べた。

【0018】細胞代謝活性は、培養の終わる3時間前に臭化3-（4,5-ジメチル-2-チアゾリル）-2,5-ジフェニル-2Hテトラゾリウムを5mg/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液を1穴当たり10マイクロリットル加え、培養終了時に20%ドデシル硫酸ナトリウム溶液を1穴当たり50マイクロリットル加え、37℃で2日放置後、マイクロプレートリーダーで培養液の吸光度550nmを測定することにより細胞代謝活性を求めた。表2にその結果を示す。

【0019】

【表2】

	検体終濃度 (mg/ml)	細胞代謝活性(吸光度550nm)		
		無刺激群	Bリンパ球 刺激群	Tリンパ球 刺激群
対照		0.034	0.108	0.213
加熱処理ラミナリビオース	2.0	0.028	0.027	0.027
	0.4	0.021	0.018	0.073
加熱処理ラミナリトリオース	2.0	0.035	0.032	0.032
	0.4	0.026	0.018	0.156
加熱処理ラミナリテトラオース	2.0	0.024	0.024	0.024
	0.4	0.026	0.024	0.229
加熱処理ラミナリペンタオース	2.0	0.030	0.028	0.028
	0.4	0.027	0.024	0.211
加熱処理ラミナリヘキサオース	2.0	0.028	0.026	0.026
	0.4	0.028	0.031	0.220

【0020】表2に示すごとく、無刺激群においては、加熱処理ラミナリビオース、加熱処理ラミナリトリオース、加熱処理ラミナリテトラオース、加熱処理ラミナリペンタオース、加熱処理ラミナリヘキサオースはいずれ

も細胞代謝活性にはほとんど影響を及ぼさなかったが、Bリンパ球刺激群においては、加熱処理ラミナリビオース、加熱処理ラミナリトリオース、加熱処理ラミナリテトラオース、加熱処理ラミナリペンタオース、加熱処理

ラミナリヘキサオースはいずれも2mg/mlおよび0.4mg/mlの濃度において細胞代謝活性の上昇を完全に抑制した。Tリンパ球刺激群においては、加熱処理ラミナリビオース、加熱処理ラミナリトリオース、加熱処理ラミナリテトラオース、加熱処理ラミナリペンタオース、加熱処理ラミナリヘキサオースはいずれも2mg/mlの濃度において細胞代謝活性の上昇を完全に抑制したが、0.4mg/mlの濃度においては、加熱処理ラミナリビオース、加熱処理ラミナリトリオースのみが細胞代謝活性の上昇を部分抑制した。この様に、加熱処理ラミナリビオ

ース、加熱処理ラミナリトリオース、加熱処理ラミナリテトラオース、加熱処理ラミナリペンタオース、加熱処理ラミナリヘキサオースはいずれも、リンパ球が活性化されるときにより選択的に働き、強度な抑制作用を示し、特に、Bリンパ球に対する作用が強く、また、リンパ球抑制活性は加熱処理ラミナリビオースおよび加熱処理ラミナリトリオースが強かった。

【0021】

【発明の効果】本発明によれば、重篤な副作用のない、優れた免疫抑制剤が提供される。

フロントページの続き

(72)発明者 日下 博昭

兵庫県宝塚市安倉南3丁目3番1-202号